

⑪ 特許公報 (B2)

昭62-49038

⑫ Int.Cl.

C 12 P 13/18
13/14
//(C 12 P 13/14
C 12 R 1:15)
(C 12 P 13/14
C 12 R 1:13)

識別記号

府内整理番号

⑬ 公告 昭和62年(1987)10月16日

7236-4B
A-7236-4B

発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 L-グルタミンの製造法

⑮ 特願 昭54-118834

⑯ 公開 昭56-42593

⑰ 出願 昭54(1979)9月18日

⑱ 昭56(1981)4月20日

⑲ 発明者 勝亦 瞽一 町田市成瀬2-12-3 ボプラケ丘コーポ6-401

⑳ 発明者 高山 健一郎 厚木市鳶尾1丁目9番10号

㉑ 出願人 協和醣業工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

審査官 佐伯 裕子

微生物の受託番号 FERM P-4412 FERM P-4414

1

2

② 特許請求の範囲

1 コリネバクテリウム属又はブレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、かつ培地中に存在する過剰のビオチンによってL-グルタミンの生産が抑制されない微生物を培地に培養し、L-グルタミンを培養物中に生成させ、該培養物からL-グルタミンを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミンを培地中に蓄積させ、これを採取する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによってL-グルタミンの生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミンの製造法に関する。

生育にビオチンを要求するL-グルタミン酸生産菌によるL-グルタミンの生産はL-グルタミン酸の生産条件に類似して培地中のビオチン濃度を菌の生育に対して制限することが必ず必須であり、さらに培地中の窒素源を炭素源に対して菌の増殖生活に必要以上加え、かつ特定量以上の重金属イオンを添加することによりL-グルタミンの生産量を増大せしめる方法が知られている(特公昭39-7391, 同42-7595, 同43-6993等)。さら

株によりL-グルタミンの生産性が高められる(特公昭51-44196)ことも知られているが、この場合も同様に培地中のビオチン濃度を制限量にすることが絶対的条件であるため、炭素源として腐糖蜜のようにビオチン含量の多い原料は安価でも使用できず、やむをえず高価な精製糖等が使われてきた。

本発明者らは過剰量のビオチンを含む安価な粗原料を用い、L-グルタミンを製造する方法につき研究した結果、従来のL-グルタミン酸またはL-グルタミン生産菌を親株として変異誘導したりゾチームに感受性を有する変異株を用いれば、過剰のビオチン含有培地を用いても、ビオチンによる抑制を受けることなく高い収率でL-グルタミンを生産できることを見出した。

以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミンの生産が抑制されない性質を有する微生物を培地に培養すれば培地中にL-グルタミンが蓄積するので、これを採取することにより高収率にL-グルタミンが得られる。

本発明に用いる微生物はコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチ

ンによってレーグルタミンの生産が抑制されない性質を有する微生物であればいかなる菌株をも用いることができる。一般にはコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、L-レーグルタミン、またはL-レーグルタミン酸生産能を有する菌株を親株とし、これを変異誘導処理して得られた変異株からリゾチームに感受性を有するものを選択し、これを用いる。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株からリゾチームに感受性を有する菌株を選択するには、親株が生育可能な濃度のリゾチームを含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地では親株と同様に生育できるものを選べばよい。従つて、ここでリゾチームに感受性であるとは、リゾチームに対する最小阻止濃度が親株よりも低いことを意味する。また培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-レーグルタミンの生産が抑制されないとは、培地中に存在する過剰のビオチンによるL-レーグルタミン生産の抑制が実質的に無視できる程度のものであることを意味する。具体的には前記のごとき粗原料を用いた場合でも過剰のビオチンによる影響をうけることなくL-レーグルタミンの生産ができるこことを意味する。

本発明に用いる具体的に好適な菌株の一例としては、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を親株として得られたコリネバクテリウム・グルタミクムKY9703(微研菌寄第4412号、NRRL11271)、およびブレビバクテリウム・ラブムATCC14067を親株として得られたブレビバクテリウム・ラブムKY9733(微研菌寄第4414号、NRRL11273)があげられる。

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を親株としてリゾチーム感受性変異株を取得する方法について以下具体的に説明する。該親株を粉末ブイヨン(極東製薬社製)20g/lおよび酵母エキス5g/lの組成を有する培地(殺菌前PH7.2、以下C培地といふ)に植菌し30°Cで振盪培養する。中期対数期で培養を中止し、集菌し、生理食塩水で洗浄後、M/20トリス・マレート緩衝液(PH6.0)に 5×10^9 細胞/mlになるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度500μg/mlになるようにニトロソグアニジンを加え、25°Cで30分間放置し、遠心分離により菌体

を集め、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈してC培地にさらに2g/mlの寒天を含む固体培地(以下CA培地といふ)に塗りつける。これを30°Cで2日間培養し、生じたコロニー(約6000)を次の3種類の固体培地にレプリカ法により塗りつける。

- ① CA培地
- ② CLA培地: CA培地を加熱殺菌後、冷却して培地の温度が45°Cまで下がつてから200mg/lになるようにリゾチームを添加した培地。
- ③ MA培地: グルコース10g/l、NH₄Cl 4g/l、尿素2g/l、KH₂PO₄ 1g/l、K₂HPO₄ 3g/l、FeSO₄ · 7H₂O 10mg/l、MgSO₄ · 7H₂O 400mg/l、MnCl₂ · 4H₂O 2mg/l、ZnSO₄ · 7H₂O 0.9mg/l、CuSO₄ · 5H₂O 0.4mg/l、Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.09mg/l、(NH₄)₂MoO₄ · 4H₂O 0.04mg/l、ビオチン30μg/l、サイアミン塩酸塩1mg/l、システィン塩酸塩20mg/lおよび寒天20g/lの組成を有する培地(殺菌前PH7.0)。

30°Cで2日間培養後、CA培地で生育し、CLA培地で生育しない菌をリゾチーム感受性変異株として得る。MA培地で親株と同様に生育する自己栄養性リゾチームに対して感受性の変異株は試験した6000コロニーの中に110株得られた。この110株中3株がビオチン過剰培地でも多量のL-レーグルタミンを生産する能力を有していた。コリネバクテリウム・グルタミクムKY9703はかくして得られた変異株の一例である。

ブレビバクテリウム・ラブムATCC14067を親株とする変異誘導も上記と同様に行って、ブレビバクテリウム・ラブムKY9733を得た。

上記例示の変異株のMA培地、CA培地、CLA培地での生育およびリゾチーム感受性度について35親株と比較した結果を第1表に示す。3種類の固体培地上での生育はレプリカ法で塗りつけ、30°Cで2日間培養後判定した。表中生育欄の+は菌の生育が観察されたものを、-は生育が観察されなかつたものを示す。また表中リゾチーム感受性は40次のように試験した。すなわちC培地にて24時間30°C液体振盪培養した菌を集菌後、生理食塩水にて適当に希釈して菌体の懸濁液をつくる。

この懸濁液 10^9 細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含有するCA培地に滴下接種し、30°C

で2日間培養する。菌の生育がまったく認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性値(最小生育阻止濃度)とした。

第 1 表

菌 株	生 育			リゾチーム 感受性度最 小生育阻止 濃度 (MIC $\mu\text{g}/\text{ml}$)
	MA 培 地	CA 培 地	CLA 培 地	
コリネバクテリウム・グルタミクム KY 9703	+	+	-	100
ATCC 13032	+	+	+	800
ブレビバクテリウム・フラブム KY 9733	+	+	-	50
ATCC 14067	+	+	+	800

本発明の微生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機化合物、その他の栄養素を適當に含む培地ならば、通常レーグルタミン生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては蔗糖、ブドウ糖、糖蜜などの糖質および澱粉糖化液などが、窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、磷酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、クエン酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素などの有機無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスチーブリカーナどの天然栄養源などが、無機化合物としては磷酸第一カリ、磷酸第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、酢酸鉛、クロム酸カリ、塩化ニッケル、塩化コバルト、硫酸亜鉛、モリブデン酸アンモニウムなどが、その他の栄養源としてはビオチン、サイアミンなどが用いられる。

培養は振盪培養、通気搅拌培養などの好気的条件で行い、培養温度は24~37°Cとくに28~33°Cが好適である。培養中は適當な中和剤を用いてpHを6~9に調整するのが好ましい。培養は1~3日間行えば培養液中に著量のL-グルタミンが生成蓄積する。培養液からのL-グルタミンの採取は、菌体を除去した上清液から、イオン交換樹脂

による吸脱着法、濃縮晶析法、等電点晶析法など、従来のL-グルタミンの製造において常用される諸方法を適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例 1

グルコース75g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20g/l, KH_2PO_4 0.5g/l, K_2HPO_4 0.5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l, サイアミン塩酸塩 10mg/l, ビオチン 3.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ あるいは100 $\mu\text{g}/\text{l}$ および CaCO_3 20g/lの組成を有する培地を調製し、pHを7.2に調整した後、30mlずつ300ml容のフラスコに入れ、115°Cで15分間加熱殺菌した。この培地に第2表に示した菌の種培養を接種し、30°Cにて40時間振盪培養した。かくして培養液中に蓄積したL-グルタミン量は第2表に示す通りであつた。

第 2 表

菌 株	L-グルタミン蓄積量 mg/ml	
	ビチオン 3.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ 添加培地	ビチオン 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 添加培地
コリネバクテリウム・ グルタミクム KY9703	12.2	19.0
ATCC13032	1.5	<0.1
ブレビバクテリウム・ フラブム KY9733	11.3	15.0
ATCC14067	1.1	<0.1

実施例 2

甘蔗廃糖蜜200g/l(グルコースとして100g/l相当量), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20g/l, KH_2PO_4 0.5g/l, K_2HPO_4 0.5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l, サイアミン塩酸塩 1mg/lの組成を有する培地3lを5lジャーファーメンターに仕込み、常法により殺菌した後、アンモニア水でpHを0.7に調整してから、第3表に示した菌の種培養300mlを植菌し、30°C、通気量5l/min, 600rpmにて培養を行つた。培養期間中はアンモニア水でpHを6.5に維持しながら36

時間培養した。培養液中に蓄積したL-グルタミン量は第3表に示す通りであつた。

KY9703株の発酵終了液1 ℥より遠心分離によつて菌体を除去して得た上清液から、イオン交換樹脂を用いる常法にしたがつてL-グルタミンの精製を行つたところ、L-グルタミンの粗結晶11.6gを得た。

第 3 表

菌 株	L-グルタミン蓄積量 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703	26.2
ATCC13032	<0.1

菌 株	L-グルタミン蓄積量 (mg/ml)
プレビバクテリウム・フラブム KY9733	23.6
ATCC14067	<0.1